

Eficiência Simbiótica de Isolados de Rizóbios Noduladores de *Cratylia argentea*, no Bioma Cerrado



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 149

Eficiência Simbiótica de Isolados de Rizóbios Noduladores de *Cratylia argentea*, no Bioma Cerrado

Giovanna Moura Calazans
Christiane Abreu de Oliveira
José Carlos Cruz
Walter José Rodrigues Matrangolo
Ivanildo Evódio Marriel

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges

Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Monica Matoso

Campanha, Roberto dos Santos Trindade, Rosângela Lacerda de

Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Giovanna Moura Calazans

1ª edição

Versão Eletrônica (2016)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Milho e Sorgo

Eficiência simbiótica de isolados de rizóbios noduladores de *Cratylia argentea*, no bioma Cerrado / Giovanna Moura Calazans [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2016.

24 p. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 149).

1. Biologia do solo. 2. Fixação de nitrogênio. 3. Leguminosa. I. Calazans, Giovanna Moura. II. Série.

CDD 631.46 (21. ed.)

© Embrapa 2016

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	12
Conclusão	19
Agradecimentos	19
Referências	20

Eficiência Simbiótica de Isolados de Rizóbios Noduladores de *Cratylia argentea*, no Bioma Cerrado

***Giovanna Moura Calazans*¹**

***Christiane Abreu de Oliveira*²**

***José Carlos Cruz*³**

***Walter José Rodrigues Matrangolo*⁴**

***Ivanildo Evódio Marriel*⁵**

Resumo

Cratylia argentea é uma leguminosa de porte arbustivo, com grande potencial forrageiro e possui elevada resistência à seca e a solos ácidos. Nativa do Cerrado, essas características lhe conferem grande potencial para recuperação de áreas degradadas neste bioma. Todavia, ainda são raros os trabalhos de seleção de estirpes de rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio (FBN) para a espécie. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi isolar estirpes de rizóbios noduladores na *C. argentea* em solo de Cerrado, caracterizá-las morfológicamente e selecionar as mais eficientes em fixação de nitrogênio.

¹Eng.-Ambiental (UNIFEMM), Bolsista FAPEMIG no período de 05/05/2011 a 31/12/2011, Mestre em Saneamento Meio Ambiente e Recursos Hídricos (UFMG)

²Eng.-Agrôn., D.Sc. em Biologia Vegetal, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151 CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, christiane.paiva@embrapa.br

³Eng.-Agr., Ph.D. Fitotecnia e Manejo de Solos, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151 CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, josecarlos.cruz@embrapa.br

⁴Eng.-Agrôn., D.SC., Agroecologia, Pesquisador Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151 CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, walter.matrangolo@embrapa.com.br

⁵Eng.-Agr., Doutor em Biologia Celular, Pesquisador em Microbiologia da Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151 CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, ivanildo.marriel@embrapa.br

Foram coletados nódulos de *C. argentea* com 12 meses de idade, cultivada em solo de cerrado, em casa de vegetação. Destes nódulos, obtiveram-se 25 estirpes, com diferentes características morfológicas e simbióticas. Estas estirpes foram inoculadas no plantio da *C. argentea* em potes de 5 kg de solo de cerrado, em casa de vegetação. Os tratamentos consistiram de 25 isolados, controle (sem N e sem inoculação) e adubação nitrogenada (5 mg N/planta/semana), em quatro repetições. Após 150 dias do plantio, as plantas foram coletadas para avaliar o número e a massa seca de nódulos e a massa seca e concentração de nitrogênio da parte aérea e raízes. Foram calculadas as eficiências de fixação de nitrogênio relativas e simbióticas. As maiores eficiências simbióticas (aproximadamente 20%) foram apresentadas pelas estirpes 4 e 22, o que indica que estas estirpes apresentam potencial para formulação de inoculantes para otimizar o processo simbiótico rizóbio-*Cratylia*.

Palavras-chave: fixação biológica; leguminosa; Cerrado

Symbiotic Efficiency of Isolates of Nodulating Rhizobia of *Cratylia argentea* in Cerrado

Giovanna Moura Calazans¹

Christiane Abreu de Oliveira²

José Carlos Cruz³

Walter José Rodrigues Matrangolo⁴

Ivanildo Evódio Marriel⁵

Abstract

Cratylia argentea is a leguminous shrub, which has great potential for forage production and has high resistance to drought and acid soils. Native to the Cerrado, these characteristics give it great potential for recovery of degraded areas in this biome. However, the selection of strains of rhizobia efficient in the biological nitrogen fixation (BNF) for the species is still rare. Thus, the objective of this study was to isolate strains of nodulating rhizobia in *C. argentea* in Cerrado soil, characterize them morphologically and select the most efficient in nitrogen fixation. Nodules from *C. argentea* of 12 months old, cultivated in Cerrado soil in greenhouse, were collected. Of these nodules, 25 strains were obtained, with different morphological and symbiotic characteristics. These strains were inoculated in the planting of *C. argentea* in 5 kg pots of Cerrado soil, in a greenhouse. The treatments consisted of 25 isolates, control (without N and without inoculation) and nitrogen fertilization (5 mg N/plant/week), in four replications. After 150 days of planting, the plants were collected to

evaluate the number and dry mass of nodules and the dry mass and nitrogen concentration of shoot and roots. Relative and symbiotic nitrogen fixation efficiencies were calculated. The highest symbiotic efficiencies (approximately 20%) were presented by strains 4 and 22, which indicates that these strains present potential for inoculant formulation to optimize the symbiotic rhizobia-*Cratylia* process.

Key words: biological fixation; leguminous; Cerrado

Introdução

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, abrangendo doze estados e ocupando área equivalente a quase um quarto do território nacional. Em razão de sua elevada quantidade e variedade de espécies endêmicas, este bioma encontra-se na lista dos *hotspots* mundiais em biodiversidade, o que implica prioridade global de conservação (MYERS et al., 2000). Contudo, este bioma apresenta-se com aproximadamente 50% de sua área desmatada e apenas 30% de sua biodiversidade original, reduzidas principalmente em função da expansão urbana e crescimento das atividades agropecuária e mineral. A importância do Cerrado no agronegócio brasileiro é expressiva, considerando que este bioma responde por mais da metade da produção nacional de grãos e de carne (BALBINO et al., 2011).

Dentre as estratégias de recuperação de áreas degradadas, recomenda-se a revegetação com espécies nativas do mesmo bioma de interesse. Neste caso, a preferência pelas plantas da família das leguminosas, principalmente arbustivas e arbóreas, justifica-se por sua capacidade de formar simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, comumente denominadas

rizóbios. Esses microrganismos têm a capacidade de incorporar o nitrogênio atmosférico na planta hospedeira, processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN). Esse processo possibilita elevado aporte de carbono e ciclagem de nutrientes, além da economia na utilização de fertilizantes químicos nitrogenados, contribuindo para uma produção sustentável (CHAER et al., 2011; MARQUES et al., 2014).

Nesse contexto, a *Cratylia argentea* (Desv.) O. Kuntze, também conhecida como camaratuba, copada ou cipó-prata é uma leguminosa (Fabaceae, Papilloneidae) endêmica do Brasil central (do Cerrado e da Caatinga), além de outros países da América do Sul (GALDINO et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2010; MARQUES et al., 2014; VALLES-DE LA MORA et al., 2014). Esta espécie destaca-se como planta de grande potencial forrageiro, pois possui porte arbustivo, profusamente ramificado, bons rendimentos de fitomassa de alto valor proteico, sementes abundantes de alto poder germinativo, elevada capacidade de rebrota, tolerância a solos ácidos de baixa fertilidade e resistência à seca devido ao seu desenvolvimento radicular vigoroso (LASCANO et al., 2002; SÁNCHEZ et al., 2007; ALPALA et al., 2011; CASTILLO-GALLEGOS et al., 2013). Tais características viabilizam sua recomendação como forrageiras em sistemas de Integração Lavoura-Pecuária, e revegetação de áreas degradadas (PAULINO et al., 2008; BALBINO et al., 2011; MARQUES et al., 2014).

No entanto, a otimização da FBN depende da inoculação de sementes de leguminosas durante o plantio, com estirpes de bactérias de alta eficiência, isto é, com alta habilidade de sobrevivência, competitividade e colonização do sistema radicular da planta hospedeira, em relação às estirpes

nativas do solo (STRALIOTTO et al., 2002). Fatores edáficos, como acidez, pH e concentração de alumínio podem limitar a formação da atividade dos nódulos e a assimilação de nitrogênio pela planta (HUNGRIA; VARGAS, 2000). Segundo Chaer et al. (2011), é de fundamental importância a seleção de estirpes de rizóbios, pois algumas espécies de bactérias fixadoras de N apresentam especificidades para cada tipo de leguminosa. Chagas Júnior (2007) complementa que é indispensável a seleção de rizóbios adaptados às condições ambientais do ecossistema de interesse.

Os estudos relacionados à seleção, caracterização fenotípica e disponibilidade de estirpes para a *C. argentea* ainda são limitados a poucas instituições, como o Centro Internacional de Agricultura (CIAT), na Colômbia e a Embrapa Agrobiologia, no Rio de Janeiro. De modo geral, a especificidade do micro versus macrossimbionte torna relevantes os estudos envolvendo a obtenção de novos isolados, nodulação e eficiência simbiótica, em particular para o Cerrado. Dentro deste contexto, Marques et al. (2014) utilizaram a *C. argentea* para recuperação de áreas degradadas no Cerrado e somente uma planta, do total de 31, apresentou associação com rizóbios nativos, fato que fortalece ainda a relevância deste trabalho e de novas pesquisas de seleção de estirpes para esta espécie.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi isolar, caracterizar e selecionar estirpes de rizóbios eficientes para fixação biológica de nitrogênio associada à leguminosa arbórea nativa do Cerrado, *C. argentea*, visando à produção de forragem e/ou a recuperação de áreas degradadas.

Material e Métodos

Os estudos foram conduzidos em casa de vegetação e no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG. O solo utilizado foi proveniente de diferentes áreas de Cerrado da região de Sete Lagoas, de solo classificado como Latossolo vermelho escuro distrófico fase Cerrado.

Cultivo das Plantas, Isolamento e Caracterização Fenotípica de Rizóbio

Os nódulos foram obtidos de mudas de *C. argentea* (com doze meses de idade, cultivadas em solo de Cerrado) como planta-isca (XAVIER et al., 1997). O isolamento e a caracterização das colônias de rizóbios foram efetuados segundo as metodologias preconizadas por Vincent (1970) e Hungria e Araújo (1994). A caracterização dos isolados bacterianos obtidos foi efetuada em meio de cultura com manitol e extrato de levedura (YMA) adicionado de vermelho congo, incubado por um período de 96 horas, a 28 °C e pH 6,8. Foram feitas as seguintes observações das características fenotípicas das colônias: COR- coloração (rosa claro; laranja; vermelha; incolor); APA- aparência (homogênea; heterogênea); TRANS- transparência (opaca; translúcida; transparente); FOR- forma (circular; irregular); BOR- borda (inteira; irregular); ELAS- elasticidade (não tem; pouca; muita); ADE- aderência à alça de platina (fácil; difícil); MUCO- consistência do muco (gomoso; viscoso; aquoso; butírico); SUP- superfície (lisa; rugosa); CRES- tempo de crescimento: rápido (em até quatro dias); lento (mais de quatro dias); Ø- diâmetro (< 1 mm; 1-2 mm; > 2 mm). Para verificação das características fisiológicas, os microrganismos foram

repicados em meio com azul de bromotimol, para observação da formação de ácido e álcalis (pH ácido; alcalino; neutro). Com base nestas características, foram pré-selecionadas 25 estirpes com características típicas de rizóbio em meio YMA para teste e seleção quanto à eficiência simbiótica com a planta hospedeira.

Teste de Eficiência Simbiótica dos Isolados de Rizóbio

Para avaliação da eficiência simbiótica das estirpes de rizóbios isoladas, amostras de solo foram coletadas em três diferentes áreas de Cerrado em Sete Lagoas (classificado como Latossolo vermelho escuro distrófico – fase Cerrado), e transferidas, sem esterilização, para vasos com capacidade de 5 kg, em casa de vegetação.

Os tratamentos testados foram: cada estirpe selecionada, controle (sem nitrogênio e sem inoculação) e adubação nitrogenada ($5 \text{ mg N planta}^{-1} \text{ semana}^{-1}$) na forma nitrato de amônio. As sementes desinfestadas superficialmente foram inoculadas com 2 mL de suspensão de células enriquecidas em meio de extrato de levedura manitol (YMA) líquido (10^8 células mL^{-1}). O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com quatro repetições. Após o desbaste final, foram deixadas três plantas por vaso. Todos os tratamentos, incluindo testemunhas, receberam periodicamente solução nutritiva isenta de nitrogênio, de acordo com Hungria e Araújo (1994).

Na coleta das plantas, aos 150 dias após o plantio, avaliaram-se número de nódulos (NN), massa seca das raízes (MSR), da parte aérea (MSPA) e dos nódulos (MSN) (após secagem em estufa a 60°C até peso constante), teor e conteúdo de N da parte aérea

e raiz. A eficiência relativa (Efr) de cada estirpe foi calculada de acordo com a expressão 1:

$$(1) \quad Efr = \frac{\text{MSPA inoculada} \times 10}{\text{MSPA com N}}$$

sendo MSPA inoculada = massa seca da parte aérea da planta inoculada; MSPA com N = massa seca da parte aérea da planta com adubação nitrogenada.

A eficiência simbiótica foi calculada por meio da expressão 2:

$$(2) \quad ES = [(N_{\text{total fixado}} - N_{\text{total TS/N}}) / (N_{\text{total TC/N}} - N_{\text{total TS/N}}) \times 100];$$

sendo N_{total fixado} = Nitrogênio total do tratamento; N_{total TS/N} = Nitrogênio total da testemunha sem nitrogênio; N_{total TC/N} = Nitrogênio total da testemunha nitrogenada.

Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade por meio do programa de estatística SISVAR, versão 5.3.

Resultados e Discussão

Isolamento e Caracterização Fenotípica de Rizóbio de Plantas de *Cratylia*

As plantas “isca” de *Cratylia* apresentaram elevado número de nódulos a partir da população natural do solo (59 a 76 nódulos vaso⁻¹). Observou-se o aparecimento de nodulação aos 70 dias após a germinação, sendo observados nódulos principalmente

nas raízes secundárias, mas também na raiz principal. Esses resultados diferem dos obtidos por Oliveira et al. (1998), que afirmaram que a nodulação da *C. argentea* ocorre somente depois dos 100 dias após a germinação e apenas em raízes secundárias.

Para o plaqueamento, foram selecionados três nódulos efetivos por planta, ou seja, aqueles que apresentaram cor rósea interna típica de efetividade. Essa cor é resultante da presença da leghemoglobina, proteína responsável pelo transporte e liberação de oxigênio nos nódulos em pressão parcial adequada para atividade da enzima nitrogenase em um processo simbiótico eficiente (DROZDOWICZ, 1977).

Em relação à caracterização fenotípica das estirpes (Figura 1), detectou-se alta variabilidade morfológica das colônias para os parâmetros avaliados, exceto em relação à transparência e superfície da colônia. Nestes casos, todas as estirpes eram translúcidas e apresentaram superfície lisa.

Observou-se a predominância de colônias de cor rosa claro (76%), forma circular e borda lisa e muco viscoso (60%). CHAGAS JR. et al. 2007 analisaram a diversidade fenotípica de rizóbios em solos da Amazônia, que nodularam plantas de feijão caupi, e verificaram uma diversidade em suas características, mas que em sua maioria também apresentaram predominância de muco viscoso, borda lisa e inteira, mas com coloração branca. Apenas 16% dos isolados desta pesquisa apresentaram elasticidade, enquanto 92% eram de fácil aderência à alça de platina. Sabe-se que a caracterização morfológica das estirpes pode fornecer informações importantes relacionadas à identificação e ao agrupamento

da bactéria (MARTINS et al., 1997), eficiência simbiótica e à diversidade dos isolados de rizóbio no ambiente (SANTOS et al., 2007). Chagas Júnior et al. (2010) comentam a importância da análise das diferenças morfológicas e fisiológicas entre microrganismos, que consiste no primeiro passo para a identificação de novos grupos taxonômicos, e orientam os próximos passos, como o uso das técnicas moleculares. Neste trabalho, dados morfológicos contribuíram para a seleção de 25 estirpes morfo-fisiologicamente diferentes, para serem avaliadas em simbiose com plantas (Tabela 1).

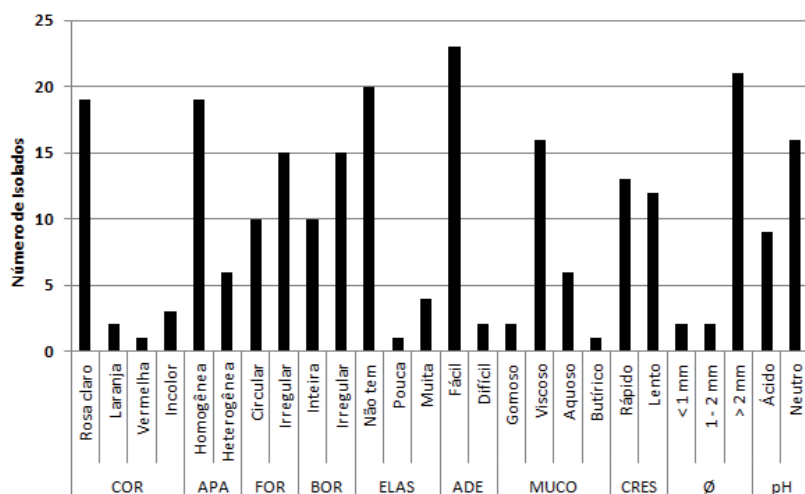


Figura 1. Distribuição dos isolados de rizóbio obtidos de nódulos radiculares de *Cratylia argentea*, quanto às características morfológicas avaliadas em cor; aparência (APA); forma (FOR); borda (BOR); elasticidade (ELAS); aderência à alça de platina (ADE); tipo de muco; velocidade de crescimento (CRES), diâmetro das colônias (Ø) e pH.

Tabela 1. Número de nódulos.vaso⁻¹ (NN)*, massa seca de nódulos (g).vaso⁻¹ (MSN), massa seca da parte aérea (g).vaso⁻¹ (MSPA), massa seca da raiz (g).vaso⁻¹ (MSR), nitrogênio da parte aérea (g).vaso⁻¹ (NPA) e nitrogênio da raiz (g).vaso⁻¹ (NR) do tratamento controle (C), dos tratamentos inoculados com as 25 estirpes isoladas (1 a 25) e da testemunha nitrogenada (N), eficiência relativa em relação à testemunha nitrogenada (ER) (%) e eficiência simbiótica (ES) (%) em relação ao acúmulo de N da testemunha nitrogenada e ao controle sem N.

Estirpes	NN	MSN (g)	MSPA (g)	MSR (g)	NPA (g)	NR (g)	ER (%)	ES (%)
C	67b**	0,27b	5,96c	4,59a	0,17c	0,08C	-	-
1	133a	0,50a	8,40b	6,31a	0,24b	0,11b	44,63	10,92
2	137a	0,43b	8,12b	6,31a	0,23b	0,14b	43,15	12,29
3	119a	0,61a	9,51b	6,67a	0,26b	0,14b	50,5	15,59
4	116a	0,61a	9,88b	6,73a	0,28b	0,15b	52,48	19,59
5	95a	0,54a	9,66b	6,17a	0,29b	0,13b	51,32	17,85
6	77b	0,37b	7,12c	5,95a	0,22b	0,14b	37,81	10,77
7	79b	0,57a	8,70b	5,73a	0,26b	0,12b	46,23	14,8
8	92a	0,51a	6,67c	7,51a	0,23b	0,18b	35,43	17,19
9	104a	0,50a	8,17b	5,89a	0,23b	0,13b	43,42	12,23
10	95a	0,52a	8,42b	6,33a	0,25b	0,15b	44,71	14,93
11	75b	0,49a	7,37c	6,40a	0,25b	0,14b	39,16	15,17
12	40c	0,22b	4,30d	2,25b	0,13c	0,05d	22,85	-6,88
13	80b	0,66a	7,48c	5,70a	0,24b	0,12b	39,72	11,35
14	106a	0,63a	7,58c	5,83a	0,25b	0,14b	40,26	14,52
15	49c	0,27b	4,34d	1,90b	0,13c	0,04d	23,04	-7,61
16	100a	0,63a	7,01c	5,86a	0,23b	0,13b	37,25	12,28
17	83b	0,59a	6,90c	5,40a	0,22b	0,13b	36,66	11,47
18	107a	0,71a	8,16b	5,60a	0,26b	0,13b	43,37	13,7
19	81b	0,58a	7,84b	5,68a	0,25b	0,12b	41,65	12,45
20	68b	0,53a	7,11c	5,38a	0,23b	0,12b	37,77	11,08
21	85a	0,55a	8,72b	5,72a	0,29b	0,12b	46,32	17,1
22	102a	0,60a	9,01b	6,07a	0,30b	0,14b	47,89	20,1
23	49c	0,27b	7,56c	1,79b	0,21b	0,03d	40,15	0,5
24	113a	0,67a	6,55c	6,07a	0,22b	0,13b	34,8	10,58
25	94a	0,52a	8,77b	5,49a	0,24b	0,10b	46,61	10,73
N	0d	-	18,82a	7,57a	0,98a	0,26a	-	-

* O número de nódulos foi transformado para log x+1 para análise estatística.

** Médias com mesma letra na coluna não diferem entre si significativamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Em relação ao acúmulo de massa seca na parte aérea (MSPA) e raízes das plantas (MSR), os valores variaram de 4,30 a 9,88 e de 1,79 a 7,51 g.vaso⁻¹, respectivamente, em função das estirpes testadas (Tabela 1). Os valores mais elevados para MSPA e MSR correspondem a aumentos de 65,8% e 63,6%, respectivamente, em relação ao tratamento controle (sem adubação e sem inoculação). Entretanto, isso equivale a 52,5% da MSPA e 88,9% da MSR das plantas cultivadas com adubação nitrogenada.

Quanto ao tempo de crescimento, das 25 estirpes estudadas, 13 apresentaram crescimento rápido (até 4 dias) e 12, crescimento lento (mais de 4 dias), indicando diversidade metabólica entre as estirpes analisadas capazes de nodular a *C. argentea*. Martins et al. (1997) comentam que o tempo de crescimento pode influenciar na produção de muco das colônias. Por exemplo, colônias de crescimento rápido produzem mais muco. Os autores ainda comentam que as características de rizóbios são variáveis e estão associadas a características bioquímicas do ambiente, e por isso a importância de se avaliar a morfologia das colônias. Outro aspecto interessante observado foi que 14 estirpes mantiveram o pH do meio de cultura em torno de 7,0, enquanto nove apresentaram baixa capacidade de acidificação do meio (pH em torno de 6,0) e duas promoveram acidificação elevada do meio de cultura, alcançando valores de pH em torno de 4,0. Norris (1965) explica que a liberação de ácido pela estirpe constitui um mecanismo de adaptação da bactéria às condições adversas. Estes resultados corroboram em partes os de Teixeira et al. (2010), que avaliaram estirpes de rizóbios da *C. mollis*, em solo da Caatinga, e observaram que a maioria dos isolados apresentou crescimento rápido e não alterou o pH do meio.

Seleção de Rizóbios Eficientes na Simbiose com *C. argentea*

Na Tabela 1 estão apresentados os dados de nodulação, crescimento e incorporação de nitrogênio nas plantas coletadas aos 150 dias após a germinação. Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tratamentos para todos os parâmetros avaliados. O número de nódulos oscilou entre 40 e 137 por vaso, com tamanhos e formas variadas, sendo a

maioria esférica, exceto nas plantas cultivadas na presença de adubação nitrogenada, que não apresentaram nodulação. Em geral, os nódulos apresentaram estrutura individual, embora tenha sido observado também o aparecimento de poucos nódulos siameses. Esses aspectos morfológicos dos nódulos também foram observados por Scheffer-Basso et al. (2000) ao analisarem nódulos de *Adesmia araujoii* (babosa), também uma espécie de ocorrência em solos ácidos e de baixa fertilidade. As características do solo podem influenciar significativamente na população de rizóbios no solo (BALA et al., 2003), o que justifica ainda a importância da seleção de isolados de *C. argentea* em solo de Cerrado.

Para o acúmulo de nitrogênio na parte aérea (NPA) e raiz (NR), os valores variaram de 0,13 a 0,30 e de 0,03 a 0,18 g.vaso⁻¹, respectivamente, sendo os valores mais elevados equivalentes a aumentos de 76 e 125%, respectivamente, em relação ao tratamento controle, e equivalentes a 31% e 69%, respectivamente, em relação à adubação nitrogenada.

De acordo com o teste de Scott Knott ($p < 0,05$), treze estirpes (1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 18, 19, 21, 22 e 25) apresentaram MSPA significativamente maior em relação às demais estirpes e ao tratamento controle, e significativamente menor em relação ao tratamento nitrogenado. Não foram encontradas diferenças significativas para MSR destas estirpes em relação ao tratamento controle e ao nitrogenado. Estas estirpes apresentaram NPA e NR significativamente menores em relação ao tratamento nitrogenado, e maiores em relação ao controle. Estes resultados indicam um potencial destas estirpes para a FBN em *C. argentea*, e, por isso, deve-se realizar

a caracterização genética dos isolados e novos testes de inoculação.

As correlações de Pearson entre massa seca total (MST: MST raiz + MST parte aérea) e Nitrogênio total (NT) (0,911), entre NT e NN (0,575) e entre MST e NN (0,607) foram positivas e significativas. Chen e Thorton (1940) *apud* Döbereiner (1966) encontraram uma relação da estrutura de nódulos efetivos de trevo, ervilha e soja com a eficiência da fixação de nitrogênio. Já Bowen (1959) *apud* Döbereiner (1966) obteve uma regressão altamente significativa da massa seca de plantas de *Centrosema pubescens*, inoculada com estirpes de rhizobium, Ou seja, estes resultados sugerem que a nodulação pode ser usada como indicador da eficiência da FBN. Em contraste, Oliveira et al. (1998) não encontraram correlação significativa entre número de nódulos e nitrogênio fixado na *C. argentea*.

Na Tabela 1 encontram-se ainda as estimativas para eficiência relativa, com base no acúmulo de massa seca e eficiência simbiótica da inoculação, com base no acúmulo de nitrogênio nas plantas. A eficiência relativa mais elevada foi de 52,5%, detectada nas plantas inoculadas com a estirpe 4, enquanto para eficiência simbiótica, valores mais elevados ocorreram nas plantas inoculadas com as estirpes 4 (19,6%) e 22 (20,1%). A correlação entre estes dois parâmetros foi altamente significativa e positiva ($R= 0,80$; $p<0,01$).

As estirpes com maiores eficiências simbióticas (ES) (4 e 22), comparadas às estirpes de eficiência simbiótica negativa (12 e 15), diferem-se basicamente em relação à velocidade de crescimento. As estirpes de maior ES apresentaram crescimento rápido, enquanto que as estirpes 12 e 15 apresentaram

crescimento lento. Santos et al. (2007) consideram que a característica de crescimento rápido pode auxiliar na capacidade competitiva da estirpe com outros microrganismos no solo, o que pode explicar tais resultados.

Esses resultados indicam que a seleção de estirpes desta leguminosa é uma prática promissora para se otimizar a interação rizóbio-*Cratylia* e, conseqüentemente, a produção de biomassa para forragens ou aporte de matéria orgânica ao solo. Os resultados denotam o potencial de duas estirpes selecionadas neste trabalho e sugerem novas pesquisas de seleção para contribuir com a otimização da fixação biológica de nitrogênio nesta espécie de planta.

Conclusão

Verificou-se alta variabilidade entre estirpes de rizóbios de *C. argentea*, isoladas em solo de Cerrado, em relação às características morfológicas, eficiência simbiótica e eficiência relativa. Houve predominância de estirpes que mantiveram o meio de cultura em pH neutro. Devem ser realizados novos ensaios e caracterização genética das estirpes 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 18, 19, 21, 22 e 25, com destaque para as estirpes 4 e 22, que obtiveram maiores eficiências simbióticas. As treze estirpes selecionadas são promissoras para testes futuros em campo visando a formulação de inoculantes para otimização da fixação biológica de nitrogênio na interação *C. argentea*-rizóbio.

Agradecimentos

Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à

Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsas e apoio financeiro ao projeto.

Referências

ALPALA, J. R.; GRISALES, S. O.; FRANCO, L. H.; PETERS, M.; RAMÍREZ, G. Sistemas de siembra de *Cratylia argentea* cultivar Veranera en dos localidades del valle del río Cauca, Colombia. **Acta Agronomica**, Palmira, v. 59, n. 4, p. 429-434, 2011.

BALA, A.; MURPHY, P. J.; OSUNDE, A. O.; GILLER, K. E. Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 211-223, 2003.

BALBINO, L. C.; BARCELLOS, A. O.; STONE, L. F. (Ed.). **Marco referencial em integração lavoura-pecuária-floresta**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011.

CASTILLO-GALLEGOS, E.; ESTRADA-FLORES, J. G.; VALLES-DE LA MORA, B.; CASTELÁN-ORTEGA, O. A.; OCAÑA-ZAVALA, E.; JARILLO-RODRÍGUEZ, J. Rendimiento total de materia seca y calidad nutritiva de hojas y tallos jóvenes de cuatro accesiones de *Cratylia argentea* en el trópico húmedo de Veracruz, México. **Avances en Investigación Agropecuaria**, v. 17, n. 1, p. 79-94, 2013.

CHAER, G. M.; RESENDE, A. S.; CAMPELLO, E. F. C.; FARIA, S. M.; BODDEY, R. M.; SCHMIDT, S. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree Physiology**, Oxford, v. 31, p. 139-149, 2011.

CHAGAS JÚNIOR, A. F. **Características agrônômicas e ecológicas de rizóbios isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia**. 2007. 157 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

CHAGAS JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbios nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 161-169, 2010.

DÖBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, London, v. 210, p. 850-852, 1966.

DROZDOWICZ, A. Bactérias do solo. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, 1977. p. 19-65.

GALDINO, A. S.; LIMA, J. P. M. S.; ANTUNES, R. S. P.; PRIOLI, J. A.; THIERS, P. R.; SILVA, G. P.; GRANGEIRO, T. B. Caracterização molecular de acessos de *Cratylia argentea* e sua relação filogenética com outras leguminosas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, n. 8, p. 846-854, 2010.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa-CNPAP, 1994. (Embrapa-CNPAP Documentos, 46).

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 151-164, 2000.

LASCANO, C.; RINCON CASTILLO, A.; PLAZAS, C. H. B.; AVILA VARGAS, P.; BUENO GUSMAN, G. A.; ARGEL, P. J. **Cultivar Veranera *Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze**: leguminosa arbustiva de usos múltiplos para zonas con períodos prolongados de sequía en Colombia. Santa Fé de Bogotá: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2002. 28 p.

MARQUES, T. D.; BAÊTA, H. E.; LEITE, M. G. P.; MARTINS, S. V.; KOZOVITS, A. R. Crescimento de espécies nativas de cerrado e de Vetiveria zizanioides em processos de revegetação de voçorocas. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 4, p. 843-856, 2014.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de “rizóbio”**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 14 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 19).

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853-858, 2000.

NORRIS, D. O. Acid production by Rhizobium a unifying concept. **Plant and Soil**, The Hague, v. 22, n. 2, p. 143-166, 1965.

OLIVEIRA, F. L.; PITARD, R. M.; SOUTO, S. M. **Seleção de estirpes de rizóbio para leguminosas *Arachis pintoi* e *Cratylia argentea***. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1998. 19 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 53).

PAULINO, V. T.; BRAGA, G. J.; LUCENA, M. A. C.; GERDES, L.; COLOZZA, M. T. Sustentabilidade de pastagens consorciadas - ênfase em leguminosas forrageiras. In: ENCONTRO TÉCNICO SOBRE LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS - SOLUÇÕES TECNOLÓGICAS, 2., 2008, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: APTA, 2008. p. 1-55.

SÁNCHEZ, N. R.; LEDIN, S.; LEDIN, I. Biomass production and nutritive composition of *Cratylia argentea* under different planting densities and harvest intervals. **Journal of Sustainable Agriculture**, Binghamton, v. 29, n. 4, p. 5-22, 2007.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, n. 4. p. 249-256, 2007.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; CARNEIRO, C. M.; VOSS, M. Nodulação e fixação biológica de nitrogênio em *Adesmia arauji* Burk. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 6, n. 1, p. 16-18, 2000.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. G.; MERCANTE, F. M. Fixação biológica de nitrogênio. In: AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F. **Produção de feijoeiro comum em várzeas tropicais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. p. 122-153.

TEIXEIRA, F. C. P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga.

Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 201-208, 2010.

VALLES-DE LA MORA, B.; CASTILLO-CALLEGOS, E.; OCAÑA-ZAVALA, E.; JARILLO-RODRÍGUEZ, J. *Cratylia argentea*: un Arbusto forrajero potencial en sistemas silvopastoriles: rendimiento y calidad de accesiones según las edades de rebrote y estaciones climáticas. **Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, Chapingo, v. 20, n. 2, p. 277-293, 2014.

VINCENT, J. M. **A manual for practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 140 p. (IBP Handbook, n. 15).

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; ZILLI, J. E.; PEIXOTO, R. C.; RUMJANEK, N. G. **Protocolo operacional cultivo de planta-isca para isolamento de rizóbio a partir de nódulo de planta-isca**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 7 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 43).

